

PCT COOPERATION TREATY

BEST AVAILABLE COPY

PCT

NOTIFICATION RELATING TO PRIORITY CLAIM

(PCT Rules 26bis.1 and 26bis.2 and
Administrative Instructions, Sections 402 and 409)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BERTRAM, Helmut
Oehmke & Kollegen
Neugasse 13
07743 Jena
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 08 November 2001 (08.11.01)	
Applicant's or agent's file reference O105-10066WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/DE01/01946	International filing date (day/month/year) 22 May 2001 (22.05.01)
Applicant DYOMICS GMBH et al	

The applicant is hereby **notified** of the following in respect of the priority claim(s) made in the international application.

1. ☒ **Correction of priority claim.** In accordance with the applicant's notice received on: **24 September 2001 (24.09.01)**, the following priority claim has been corrected to read as follows:

DE 23 May 2000 (23.05.00) 200 22 277.5

☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.
☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:

2. ☐ **Addition of priority claim.** In accordance with the applicant's notice received on: , the following priority claim has been added:

☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.
☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:

3. ☐ As a **result of the correction and/or addition** of (a) priority claim(s) under items 1 and/or 2, the (earliest) priority date is:

4. ☐ **Priority claim considered not to have been made.**

☐ The applicant failed to respond to the Invitation under Rule 26bis.2(a) (Form PCT/IB/316) within the prescribed time limit.
☐ The applicant's notice was received after the expiration of the prescribed time limit under Rule 26bis.1(a).
☐ The applicant's notice failed to correct the priority claim so as to comply with the requirements of Rule 4.10.
 The applicant may, before the technical preparations for international publication have been completed and subject to the payment of a fee, request the International Bureau to publish, together with the international application, information concerning the priority claim. See Rule 26bis.2(c) and the PCT Applicant's Guide, Volume I, Annex B2(1B).

5. ☐ In case where **multiple priorities** have been claimed, the above item(s) relate to the following priority claim(s):

6. A copy of this notification has been sent to the receiving Office and

☐ to the International Searching Authority (where the international search report has not yet been issued).
☒ the designated Offices (which have already been notified of the receipt of the record copy).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Ellen MOYSE
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

100

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BERTRAM, Helmut
Oehmke & Kollegen Patentanwälte
Neugasse 13
07743 Jena
ALLEMAGNE

Date:		PE-No:	
8.12.01		4141	
B	E	G	S

Date of mailing (day/month/year) 29 November 2001 (29.11.01)		
Applicant's or agent's file reference O105-10066WO		
IMPORTANT NOTICE		
International application No. PCT/DE01/01946	International filing date (day/month/year) 22 May 2001 (22.05.01)	Priority date (day/month/year) 23 May 2000 (23.05.00)
Applicant DYOMICS GMBH et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has **communicated**, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:

KP, KR, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE, AL, AM, AP, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, EA, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, OA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 29 November 2001 (29.11.01) under No. WO 01/90253

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and the PCT Applicant's Guide, Volume II.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.91.11
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------



Continuation of Form PCT/IB/308

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF
THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

Date of mailing (day/month/year) 29 November 2001 (29.11.01)	IMPORTANT NOTICE
Applicant's or agent's file reference O105-10066WO	International application No. PCT/DE01/01946
<p>The applicant is hereby notified that, at the time of establishment of this Notice, the time limit under Rule 46.1 for making amendments under Article 19 has not yet expired and the International Bureau had received neither such amendments nor a declaration that the applicant does not wish to make amendments.</p>	



PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) O105-10066WO

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Stabile NIR-Marker-Farbstoffe auf der Basis von Benzopyrylium-Polymethinen

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Dyomics GmbH
Winzerlaer Straße 2a
D-07745 Jena
Deutschland

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:
+49(0) 3641/50760

Telefaxnr.:
+49(0) 3641/507629

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☒ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

CZERNEY, Peter
Bodelschwinghstraße 137
D-99425 Weimar
Deutschland

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

BERTRAM, Helmut
FREITAG, Joachim
OEHMKE, Volker
SCHALLER, Renate

OEHMKE & KOLLEGEN
Neugasse 13
D-07743 Jena
Deutschland

Telefonnr.:
+49(0) 3641 50760

Telefaxnr.:
+49(0) 3641 507629

Fernschreibnr.:

☐ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.



Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

FRANK, Wilhelm
Grietgasse 6
D-07743 Jena
Deutschland

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

LEHMANN, Frank
Camsdorfer Straße 22
D-07749 Jena
Deutschland

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

SCHWEDER, Bernd
Leipziger Straße 67
D-07743 Jena
Deutschland

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

WENZEL, Matthias
Brändströmstraße 4
D-07749 Jena
Deutschland

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.



Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☒ **AP ARIPO-Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swasiland, TZ Vereinigte Republik Tansania, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ **EA Eurasisches Patent:** AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP Europäisches Patent:** AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **OA OAPI-Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE Vereinigte Arabische Emirate | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien | <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan | <input checked="" type="checkbox"/> MA Marokko |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica | <input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Kroatien | <input checked="" type="checkbox"/> TZ Vereinigte Republik Tansania |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN Indien | |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Island | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input checked="" type="checkbox"/> ZA Südafrika |
| | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | Kästchen für die Bestimmung von Staaten, die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind: |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz a auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung (einschließlich der Gebühren) muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)



Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH <input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.				
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		ationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung: regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) (23/05/00) 23. Mai 2000	100 25 820.4	DE		
Zeile (2) (06/03/01) 06. März 2001 (23.05.00)	200 22 277.5	DE		
Zeile (3)				

☒ Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) 1, 2 bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)

* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA)
(falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden):

ISA /

Antrag auf Notzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):

Datum (Tag/Monat/Jahr)

Aktenzeichen

Staat (oder regionales Amt)

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE

Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:

Antrag : 5

Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 10

Ansprüche : 7

Zusammenfassung : 1

Zeichnungen : 3

Sequenzprotokollteil der Beschreibung :

Blattzahl insgesamt : 26

Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- ☒ Blatt für die Gebührenberechnung
- ☒ Gesonderte unterzeichnete Vollmacht
- ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):
- ☐ Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
- ☐ Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet:
- ☐ Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
- ☐ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material
- ☐ Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form
- ☒ Sonstige (einzeln auflisten): Scheck Nr. 0810120004295

Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):

Sprache, in der die internationale Anmeldung deutsch eingereicht wird:

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.



Volker Oehmke
(Patentanwalt)

Vom Anmeldeamt auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:	
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:		
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:		
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind):	ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:



Zusatzfeld Wird dieses Zusatzfeld nicht benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.

1. Wenn der Platz in einem Feld nicht für alle Angaben ausreicht: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. ..." [Nummer des Feldes angeben] und machen die Angaben entsprechend der in dem Feld, in dem der Platz nicht ausreicht, vorgeschriebenen Art und Weise, insbesondere:

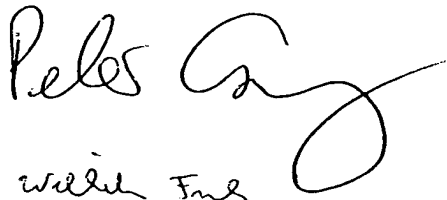
- (i) Wenn mehr als zwei Anmelder und/oder Erfinder vorhanden sind und kein "Fortsetzungsblatt" zur Verfügung steht: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. III" und machen für jede weitere Person die in Feld Nr. III vorgeschriebenen Angaben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.
- (ii) Wenn in Feld Nr. II oder III die Angabe "die im Zusatzfeld angegebenen Staaten" angekreuzt ist: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. II", "Fortsetzung von Feld Nr. III" bzw. "Fortsetzung von Feld Nr. II und Nr. III" und geben den Namen des Anmelders oder die Namen der Anmelder an und neben jedem Namen den Staat oder die Staaten (und/oder ggf. ARIPO-, eurasisches, europäisches oder OAPI-Patent), für die die bezeichnete Person Anmelder ist.
- (iii) Wenn der in Feld Nr. II oder III genannte Erfinder oder Erfinder/Anmelder nicht für alle Bestimmungsstaaten oder für die Vereinigten Staaten von Amerika als Erfinder benannt ist: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. II", "Fortsetzung von Feld Nr. III" bzw. "Fortsetzung von Feld Nr. II und Nr. III" und geben den Namen des Erfinders oder die Namen der Erfinder an und neben jedem Namen den Staat oder die Staaten (und/oder ggf. ARIPO-, eurasisches, europäisches oder OAPI-Patent), für die die bezeichnete Person Erfinder ist.
- (iv) Wenn zusätzlich zu dem Anwalt oder den Anwälten, die in Feld Nr. IV angegeben sind, weitere Anwälte bestellt sind: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. IV" und machen für jeden weiteren Anwalt die entsprechenden, in Feld Nr. IV vorgeschriebenen Angaben.
- (v) Wenn in Feld Nr. V bei einem Staat (oder bei OAPI) die Angabe "Zusatzpatent" oder "Zusatzzertifikat," oder wenn in Feld Nr. V bei den Vereinigten Staaten von Amerika die Angabe "Fortsetzung" oder "Teilfortsetzung" hinzugefügt wird: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. V" und geben den Namen des betreffenden Staats (oder OAPI) an und nach dem Namen jedes solchen Staats (oder OAPI) das Aktenzeichen des Hauptschutzrechts oder der Hauptschutzrechtsanmeldung und das Datum der Erteilung des Hauptschutzrechts oder der Einreichung der Hauptschutzrechtsanmeldung.
- (vi) Wenn in Feld Nr. VI die Priorität von mehr als drei früheren Anmeldungen beansprucht wird: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. VI" und machen für jede weitere frühere Anmeldung die entsprechenden, in Feld Nr. VI vorgeschriebenen Angaben.
- (vii) Wenn in Feld Nr. VI die frühere Anmeldung eine ARIPO Anmeldung ist: In diesem Fall schreiben Sie "Fortsetzung von Feld Nr. VI" und geben, unter Angabe der Nummer der Zeile, in der die die frühere Anmeldung betreffenden Angaben gemacht sind, mindestens einen Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums oder ein Mitglied der Welthandelsorganisation (WTO) (das nicht Mitgliedstaat der Verbandsübereinkunft ist) an, und für den/das die frühere Anmeldung erfolgte.

2. Wenn, im Hinblick auf die Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen in Feld Nr. V, der Anmelder Staaten von dieser Erklärung ausnehmen möchte: In diesem Fall schreiben Sie "Bestimmung(en), die von der Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen ausgenommen ist(sind)" und geben den Namen oder den Zweibuchstaben-Code jedes so ausgeschlossenen Staates an.

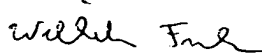
3. Wenn der Anmelder für irgendein Bestimmungsamt die Vorteile nationaler Vorschriften betreffend unschädliche Offenbarung oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit in Anspruch nimmt: In diesem Fall schreiben Sie "Erklärung betreffend unschädliche Offenbarung oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit" und geben im folgenden die entsprechende Erklärung ab.

Fortsetzung von Feld Nr. IX:

Peter CZERNEY



Wilhelm FRANK



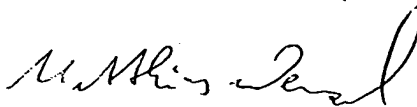
Frank LEHMANN



Bernd SCHWEDER



Matthias WENZEL





VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 0105-10066W0	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 35%; vertical-align: top;"> WEITERES VORGEHEN </td> <td style="width: 65%; vertical-align: top;"> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5 </td> </tr> </table>		WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5			
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 01/01946	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 22/05/2001	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 23/05/2000		
Anmelder DYOMICS GMBH et al.				

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. ☐ **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.



A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C09B23/02 C09B23/01 G01N33/53 G01N33/58 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C09B G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 43 41 618 A (UNIV SCHILLER JENA) 8. Juni 1995 (1995-06-08) das ganze Dokument ---	1-4, 9-20
A	GADJEV N ET AL: "MONOMETHINE CYANINE DYES CONTAINING BENZ'c,d!INDOLE AND PYRYLIUM END-GROUPS" DYES AND PIGMENTS, ELSEVIER APPLIED SCIENCE PUBLISHERS. BARKING, GB, Bd. 24, Nr. 2, 1994, Seiten 93-98, XP000434501 ISSN: 0143-7208 Formeln 5a - 5f; Tabelle I ---	1
A	US 3 567 438 A (BROOKER LESLIE G S ET AL) 2. März 1971 (1971-03-02) Beispiele 1,2,4,5 ---	1
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Oktober 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

05/11/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ketterer, M



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 198829 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class E23, AN 1988-202526 XP002181113 & JP 63 141068 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD), 13. Juni 1988 (1988-06-13) Zusammenfassung ---	1
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 198829 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class E23, AN 1988-200310 XP002181114 -& JP 63 136054 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD) , 8. Juni 1988 (1988-06-08) Zusammenfassung -----	1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

DE 01/01946

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4341618	A	08-06-1995	DE 4341618 A1	08-06-1995
US 3567438	A	02-03-1971	BE 730291 A	01-09-1969
			DE 1804316 A1	16-10-1969
			FR 2004640 A5	28-11-1969
			GB 1243714 A	25-08-1971
JP 63141068	A	13-06-1988	NONE	
JP 63136054	A	08-06-1988	NONE	



(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. November 2001 (29.11.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/90253 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C09B 23/62**,
23/01, G01N 33/533, 33/58, C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/01946

(22) Internationales Anmeldedatum:
22. Mai 2001 (22.05.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 25 820.4 23. Mai 2000 (23.05.2000) DE
200 22 277.5 23. Mai 2000 (23.05.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **DYOMICS GMBH** [DE/DE]; Winzerlaer Strasse 2a,
07745 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **CZERNEY, Peter**

[DE/DE]; Bodelschwinghstrasse 137, 99425 Weimar
(DE). **FRANK, Wilhelm** [DE/DE]; Grietgasse 6, 07743
Jena (DE). **LEHMANN, Frank** [DE/DE]; Camsdorfer
Strasse 22, 07749 Jena (DE). **SCHWEDER, Bernd**
[DE/DE]; Leipziger Strasse 67, 07743 Jena (DE). **WEN-
ZEL, Matthias** [DE/DE]; Brändströmstrasse 4, 07749
Jena (DE).

(74) Anwälte: **BERTRAM, Helmut** usw.; Oehmke & Kolle-
gen, Neugasse 13, 07743 Jena (DE).

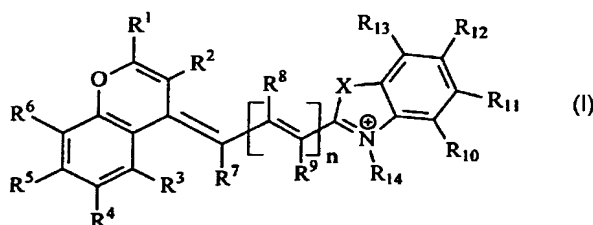
(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK,
DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: STABLE NEAR-INFRARED (NIR) MARKER DYES BASED ON BENZOPYRYLIUM-POLYMETHINES

(54) Bezeichnung: STABILE NIR-MARKER-FARBSTOFFE AUF DER BASIS VON BENZOPYRYLIUM-POLYMETHINEN



(57) Abstract: The invention relates to so-called laser-compatible NIR marker dyes based on polymethines for use in optical, in particular, fluorescence optical determination and detection methods, for example, in the fields of medicine, pharmaceuticals and in the areas of life science, materials science and environmental science. The aim of the invention was to create NIR marker dyes based on polymethine which have a high degree of photostability and stability in storage as well as a high fluorescent yield and which can be excited to fluorescence in the easiest possible manner by means of laser radiation in the visible or NIR spectral range, particularly with light of an argon, helium/neon, or diode laser. According to the invention, dyes based on polymethines of general formula (I) are used.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft sogenannte Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe auf der Basis von Polymethinen zur Verwendung in optischen, insbesondere fluoreszenzoptischen, Bestimmungs- und Nachweisverfahren, beispielsweise in der Medizin, in der Pharmazie sowie in der Bio-, Material- und Umweltwissenschaft. Aufgabe war es, NIR-Marker-Farbstoffe auf Polymethin-Basis mit hoher Photo- und Lagerstabilität sowie hoher Fluoreszenzausbeute zu schaffen, die auf möglichst einfache Weise durch Laserstrahlung im sichtbaren oder NIR-Spektralbereich, insbesondere mit Licht eines Argon-, Helium/Neon- oder Diodenlasers, zur Fluoreszenz angeregt werden können. Erfindungsgemäss werden Farbstoffe auf der Basis von Polymethinen der allgemeinen Formel (I) eingesetzt.

WO 01/90253 A1



OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Stabile NIR-Marker-Farbstoffe auf der Basis von Benzopyrylium-Polymethinen

Die Erfindung betrifft sogenannte Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe auf der Basis von Polymethinen zur Verwendung in optischen, insbesondere fluoreszenzoptischen, Bestimmungs- und Nachweisverfahren. Typische Verfahrensanwendungen beruhen auf der Reaktion von farbstoffmarkierten Antigenen, Antikörpern, Liganden oder DNA-Segmenten mit der jeweils komplementären Spezies.

Einsatzmöglichkeiten ergeben sich beispielsweise in der Medizin und der Pharmazie, in der Bio- und Materialwissenschaft, bei der Umweltkontrolle und dem Nachweis von in Natur oder Technik vorkommenden organischen und anorganischen Mikroproben, sind jedoch nicht auf die genannten Bereiche beschränkt.

Polymethine sind als NIR-Marker seit langem bekannt und zeichnen sich durch intensive, leicht in den NIR-Bereich verschiebbare Absorptionsmaxima aus (Fabian, J.; Nakazumi, H.; Matsuoka, M.: Chem. Rev. 1992, 92, 1197). Bei geeignetem Substituentenmuster und π -Elektronensystem fluoreszieren sie mit ausreichender Quantenausbeute auch im roten und nahem infraroten (NIR)-Bereich. Entsprechend finden diese Verbindungen breite Anwendung in verschiedenen Bereichen der Technik, als Sensibilisatoren in AgX-Materialien, als Laserfarbstoffe, als Quantenzähler, als Indikator-Farbstoffe in der Sensorik, als Licht-Absorber in beschreibbaren CD's und nicht zuletzt als Biomarker („Near-Infrared Dyes for High Technology Applications“, herausgegeben von Daehne, S.; Resch-Genger, U.; Wolfbeis, O.-S., Kluwer, Academic Publishers - Dordrecht/Boston/ London - 1998).

Die Anzahl der als Biomarker verwendeten Polymethine ist begrenzt. Breite kommerzielle Anwendung haben in diesem Sinne bisher nur das sich vom Astraphloxin (DE 410 487) abgeleitete Trimethin Cy3, bzw. das vinyloge Pentamethin Cy5 und das doppelt vinyloge Heptamethin Cy7 mit Absorptionsmaxima bei ca. 550 nm, ca. 650 nm und ca. 750 nm gefunden (US-PS 5 627 027). Darüber hinaus werden das polysulfonierte, vom kommerziellen Heptamethin "Indocyaningreen" bzw. "Cardio Green" abgeleitete Trimethin Cy3.5 und Pentamethin Cy5.5 angeboten (US-PS 5 569 766). In der Polymethinkette aliphatisch verbrückte Heptamethine wurden von Patonay entwickelt (US-PS 5 800 995). Charakteristisch für alle kommerziellen Biomarker sind die sich vom Inden bzw. Heteroinden (Fischer-Base) ableitenden terminalen Heteroaromaten. Werden methylsubstituierte Cycloimonium-Salze dieses Typs als terminale Polymethin-Bausteine verwendet, so ist es notwendig, mindestens fünf

aufeinander folgende sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome (Pentamethine) zwischen den Heterocyclen anzuordnen, um Absorptionsmaxima an der Grenze zum NIR-Bereich zu erzeugen.

Ein wesentlicher Nachteil der als Biomarker technisch genutzten NIR-Polymethine besteht darin, dass mit Verlängerung der Polymethinkette im steigenden Maße nucleophile bzw. elektrophile Angriffsmöglichkeiten auf die Kette gegeben sind, in deren Folge es zur Zerstörung des π -Systems kommt. Weitere Nachteile dieser Marker-Farbstoffe bestehen in einer ungenügenden Photo- oder Lagerstabilität, in aufwendigen Synthese- und Reinigungsschritten, in geringen Absorptionskoeffizienten bzw. einer unbefriedigenden Fluoreszenzquantenausbeute sowie in unerwünschten Änderungen der optischen Eigenschaften in Gegenwart von Proteinen oder Nucleinsäureoligomeren bzw. nach Bindung an diese. Beispielsweise wurde eine Verminderung der Fluoreszenzquantenausbeute von Cy5 beim kovalenten Binden an verschiedene Albumine beschrieben (Oswald, B.; Patsenker, L.; Duschl, J.; Szmecinski, H.; Wolfbeis, O.S.; Terpetschnig, E.; Bioconjugate Chem. 1999, 10, 925-931).

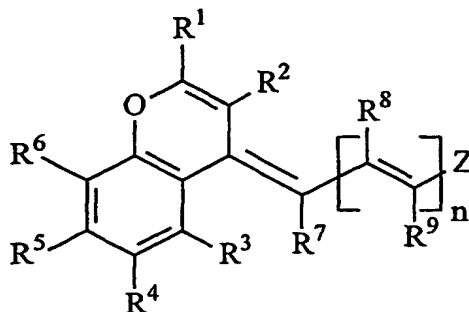
Die Verwendung von Pyrylium- und Benzopyrylium-Heterocyclen bzw. den entsprechenden mesomeren Chromenen als terminale Endgruppen in Markerfarbstoffen in biologisch relevanten Systemen ist bisher nicht bekannt. Dies ist auf die extreme Hydrolyseempfindlichkeit dieser π -Mangelaromaten, vor allem in wässrig-basischem Milieu, zurückzuführen (H. Lietz, G. Haucke, P. Czerney, B. John, J. Prakt. Chem., 1996, 338, 725-730).

Telfer et al. (US-Patent 5 262 549) beschreiben symmetrische Trimethine auf der Basis von 2-alkyl-substituierten Benzopyryliumsalzen für die Verwendung als NIR-Absorber in polymeren Medien, wobei die Aggregationsneigung in diesen Medien reduziert ist.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, NIR-Marker-Farbstoffe auf Polymethin-Basis mit hoher Photo- und Lagerstabilität sowie hoher Fluoreszenzausbeute zu schaffen, die auf möglichst einfache Weise durch Laserstrahlung im langwelligen sichtbaren oder im nahen IR-Spektralbereich, insbesondere mit Licht des Helium/Neon- oder Diodenlasers, zur Fluoreszenz angeregt werden können.

Die vorliegende Erfindung beschreibt Marker-Farbstoffe auf der Basis von unsymmetrischen Polymethinen, die eine substituierte ω -(Benz[b]pyran-4-yliden)alk-1-enyl)-Einheit der allgemeinen Struktur I

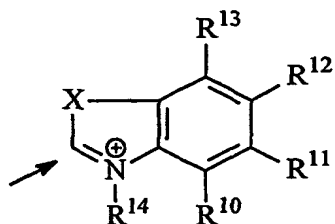
3



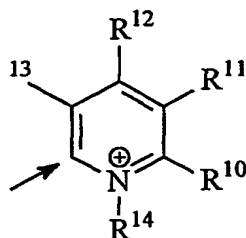
I

enthalten mit Z als substituierten Benzooxazol-, Benzothiazol-, 2,3,3-Trimethylindolenin-, 2,3,3-Trimethyl-4,5-benzo-3H-indolenin-, 2- und 4-Picolin-, Lepidin-, Chinaldin- sowie 9-Methylacridinderivaten der allgemeinen Formeln IIa oder IIb oder IIc

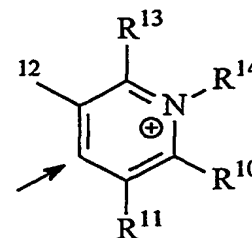
5



IIa



IIb



IIc

wobei

- X für ein Element aus der Gruppe O, S, Se oder das Strukturelement N-alkyl oder C(alkyl)₂ steht,
- n für die Zahlenwerte 1, 2 oder 3 steht,
- R¹ - R¹⁴ gleich oder unterschiedlich sind und Wasserstoff, ein oder mehrere Alkyl-, oder Aryl-, Heteroaryl- oder heterocycloaliphatische Reste, eine Hydroxy- oder Alkoxygruppe, eine alkylsubstituierte oder cyclische Aminfunktion sein können und/oder zwei ortho-ständige Reste, z. B. R¹⁰ und R¹¹, zusammen einen weiteren aromatischen Ring bilden können,

- 5 - mindestens einer der Substituenten $R^1 - R^{14}$ einen solubilisierenden bzw. ionisierbaren bzw. ionisierten Substituenten, wie Cyclodextrin, Zucker, SO_3^- , PO_3^{2-} , COO^- , oder NR_3^+ darstellen kann, der die hydrophilen Eigenschaften dieser Farbstoffe bestimmt, wobei dieser Substituent auch über eine Spacergruppe am Markerfarbstoff angebunden sein kann,
- 10 - mindestens einer der Substituenten $R^1 - R^{14}$ für eine reaktive Gruppe stehen kann, welche eine kovalente Verknüpfung des Farbstoffs mit den oben genannten Trägermolekülen ermöglicht, wobei dieser Substituent auch über eine Spacergruppe am Markerfarbstoff angebunden sein kann, und
- 15 - R^1 einen Substituenten darstellt, der in α -Position zum Pyran-Ring ein quartäres C-Atom aufweist. Beispiele für einen solchen Substituenten sind t-Butyl ($-C(CH_3)_3$) und Adamantyl ($-C_{10}H_{15}$ / Tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decyl).

In den Unteransprüchen 2-20 sind spezielle Ausführungsformen und Anwendungen zu den Marker-Farbstoffen aufgeführt.

20 Diese substituierten Indol-, Heteroindol-, Pyridin-, Chinolin- oder Acridinderivate der allgemeinen Formel I können als Farbstoffe zur optischen Markierung von organischen oder anorganischen Mikropartikeln, z. B. von Proteinen, Nucleinsäuren, DNA, Zuckern, biologischen Zellen, Lipiden, Pharmaka oder organischen bzw. anorganischen polymeren Trägermaterialien verwendet werden.

25 Die Markierung der Partikel kann dabei durch die Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen zwischen den Markern der allgemeinen Formel I und den zu markierenden Materialien erfolgen.

30 Die gegenüber Nucleophilen aktivierten funktionellen Gruppen dieser Marker vermögen kovalent an eine OH-, NH_2 - oder SH-Funktion zu koppeln. Somit entsteht ein System zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung von organischen und anorganischen Materialien, wie den besagten Proteinen, Nukleinsäuren, DNA, Zuckern, biologische Zellen, Lipiden, Pharmaka oder organischen bzw. anorganischen Polymeren.

35 Diese Kopplungsreaktion kann in wässriger oder überwiegend wässriger Lösung und vorzugsweise bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Dabei entsteht ein Konjugat mit fluoreszenten Eigenschaften.

Durch die Darstellung von nichtsymmetrischen Polymethinen, die einerseits als terminale Funktion einen leicht derivatisierbaren Heterocyclus vom Typ der Pyridin-, Chinolin-, Indol-, Heteroindol- bzw. Acridinderivate sowie andererseits einen neuartigen 6-Ringheterocyclus aufweisen, werden insbesondere nachfolgende Vorteile erreicht:

Bereits Trimethine absorbieren im Spektralbereich > 650 nm und zeigen eine gegenüber den bisher bekannten Polymethinen mit Absorptionsmaxima > 650 nm (Penta- und Hepta-methine) eine wesentlich verbesserte photochemische und thermische Stabilität.

Durch „molecular engineering“ ist es möglich, Lage und Intensität der Absorptions- und Emissionsmaxima beliebig zu steuern und den Emissionswellenlängen unterschiedlicher Anregungslaser, vor allem NIR-Laserdioden, anzupassen.

Die Marker-Farbstoffe sind durch relativ einfache und in zwei Stufen durchzuführende Synthese herstellbar, mit welcher eine Vielzahl unterschiedlich funktionalisierter Farbstoffe, beispielsweise hinsichtlich der Gesamtladung des Farbstoffes und der Anzahl, Spezifität und Reaktivität der zur Immobilisierung genutzten aktivierten Gruppen, anwendungsspezifisch zur Verfügung gestellt werden kann.

Sowohl die Verbindungen der allgemeinen Formel I als auch davon abgeleitete Systeme (Konjugate) können in optischen, insbesondere fluoreszenzoptischen, qualitativen und quantitativen Bestimmungsverfahren zur Diagnostik von Zelleigenschaften, in Biosensoren (point of care-Messungen), Erforschung des Genoms und in Miniaturisierungstechnologien eingesetzt werden. Typische Anwendungen erfolgen in der Zytometrie und Zellsortierung, der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), im Ultra-High-Throughput-Screening (UHTS), bei der multicolor Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und in Mikroarrays (Gen- und Proteinchips).

Dabei ist ein Mikroarray eine rasterartige Anordnung von auf mindestens einer Oberfläche immobilisierten Molekülen, die zum Studium von Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen verwendet werden können. Eine rasterartige Anordnung bedeutet mehr als zwei voneinander verschiedene Moleküle, welche sich innerhalb einer Fläche befinden und dort in unterschiedlichen, vorher definierten Regionen mit bekannter Position immobilisiert sind.

Ein Rezeptor ist ein Molekül, das eine Affinität zu einem gegebenen Liganden besitzt. Rezeptoren können natürlich vorkommende oder künstlich hergestellte Moleküle sein.

Rezeptoren können in reiner Form oder gebunden an andere Spezies eingesetzt werden. Rezeptoren können kovalent oder nichtkovalent entweder direkt oder durch bestimmte Kopplungsvermittler an einen Bindungspartner angeknüpft werden.

- 5 Beispiele für Rezeptoren, die durch diese Erfindung detektiert werden können, schließen Agonisten und Antagonisten für Zell-Membran-Rezeptoren, Toxine und andere Giftstoffe, virale Epitope, Hormone wie Opiate und Steroide, Hormonrezeptoren, Peptide, Enzyme, Enzymsubstrate, als Kofaktoren agierende Wirkstoffe, Lektine, Zucker, Oligonukleotide, Nukleinsäuren, Oligosaccharide, Zellen, Zellfragmente, Gewebefragmente, Proteine und Antikörper ein, sind aber
10 nicht auf die angeführten Stoffe beschränkt.

- Ein Ligand ist ein Molekül, das von einem bestimmten Rezeptor erkannt wird. Beispiele für Liganden, die durch diese Erfindung detektiert werden können, schließen Agonisten und Antagonisten für Zell-Membran-Rezeptoren, Toxine und
15 andere Giftstoffe, virale Epitope, Hormone wie Opiate und Steroide, Hormonrezeptoren, Peptide, Enzyme, Enzymsubstrate, als Kofaktoren agierende Wirkstoffe, Lektine, Zucker, Oligonukleotide, Nukleinsäuren, Oligosaccharide, Proteine und Antikörper ein, sind aber nicht auf die angeführten Stoffe beschränkt.

- 20 Die Erfindung soll nachstehend anhand von Ausführungsbeispielen und Zeichnungen näher erläutert werden.

In den dazugehörigen Zeichnungen zeigt

- 25 Fig. 1 Strukturformel von Benzopyrylium-Salz 2a
Fig. 2 Synthese und Strukturformel von Benzopyrylium-Salz 2b
Fig. 3 Synthese und Strukturformel von Trimethin OB11 (DY-630)
Fig. 4 Fluoreszenzspektren von OB15 (DY-635) in wäßriger Lösung und gebunden an Rinderserum-Albumin (BSA)
30 Fig. 5 Fluoreszenzanregungsspektren von OB15 (DY-635) in wäßriger Lösung und gebunden an Rinderserum-Albumin (BSA)

Ausführungsbeispiele:

1. Vorschrift zur Darstellung von 11-(2,2-Dimethylethyl)-9-methyl-1H,2H,3H,5H,6H,7H-pyrano[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]chinolin-12-ium tetrafluoroborat 2b (BS 28), vgl. Fig. 2:

5 Zu einer gekühlten Lösung von 7.3 g (0.0245 mol) 11-(2,2-Dimethylethyl)-1H,2H,3H,5H,6H,7H-pyrano[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]chinolin-9-on in 50 ml Ethylenglycoldimethylether werden tropfenweise 50 ml einer 1.0 molaren Lösung von Methylmagnesiumbromid in Dibutylether gegeben. Die Mischung wurde für
10 30 Minuten auf 40°C erwärmt. Nach Kühlung auf 0°C wurde 70 ml gesättigte NH₄Cl-Lösung und verdünnte Salzsäure zur Hydrolyse zugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und mit 4 x 10 ml Diethylether extrahiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand in 20 ml Eisessig gelöst. Zugabe von 3 ml HBF₄ (48 - 50 %) und Verdünnen mit
15 Diethylether führte zu einem Niederschlag, der abfiltriert und aus Eisessig umkristallisiert wird.
3.35 g (35 %) Ausbeute, 175-80°C Schmelzpunkt. - ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃ + CF₃CO₂D): 1.43 (s, 9H), 1.90 (m, 2H), 2.06 (m, 2H), 2.67 (m, 2H), 2.92 (m, 2H), 3.35 (m, 2H), 3.57 (m, 2H), 3.95 (s, 3H), 6.90 (s, 1H), 7.58 (s, 1H): - C₂₀H₂₆BF₄NO (383.24): ber. C 62.68, H 6.84, N 3.65, gef. C 63.06, H 6.72, N 3.48.

2. Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der unsymmetrischen Trimethine OB 11, OB 14, OB 15 und OB 20:

25 0.01 mol vom entsprechenden 4-Methyl-benzopyrylium-tetrafluoroborat der Formel 2a (BS4) oder 2b (BS28) (vgl. Fig. 1 und 2) und 0.01 mol methylenaktiver N-Heterocyclus wurden in 20 ml Acetanhydrid gelöst, mit 2,0 g Triethoxymethan und 5 ml Pyridin versetzt und ca. 10 min erhitzt. Nach dem Abkühlen der Lösung auf RT wurde das Farbstoffrohprodukt mit ca. 30 ml Diethylether ausgefällt. Der
30 Niederschlag wurde abfiltriert und säulenchromatographisch gereinigt.

3. 1-(5-Carboxypentyl)-3,3-dimethyl-2-[3-(7-N,N-diethylamino-2-(1,1-dimethylethyl)-4H-benzopyran-4-yliden)-1-propenyl]-3H-indolium-5-sulfonat OB 11(DY-630):

0.01 mol 2a und 0.01 mol 1-(5-Carboxypentyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolium-5-sulfonat wurden entsprechend der allgemeinen Vorschrift 1 umgesetzt, vgl. Fig.3. Säulenchromatographie: SiO₂, Eluent Ethanol. 3.2 g (50 %) Ausbeute, 280-82°C Schmelzpunkt. - ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 1.10 – 1.86 (m, 27H), 2.16 (m, 2H), 3.54 (m, 4H), 4.13 (m, 2H), 6.58 (d, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 7.06 (d, 1H), 7.14 (d, 1H), 7.36 (d, 1H), 7.68 (d, 1H), 7.78 (s, 1H), 8.08 (d, 1H), 8.32 (t, 1H) - ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 12.30, 21.51, 24.32, 25.66, 26.56, 27.55, 34.07, 36.37, 43.72, 44.22, 48.87, 96.36, 99.40, 104.11, 109.85, 110.28, 112.48, 113.27, 119.66, 126.09, 140.23, 141.81, 145.59, 147.09, 162.14, 172.33, 174.64 - MS (FAB in dmba): 657 (M+Na⁺), 635 (M+H⁺), 391, 359, 258, 257 - C₃₆H₄₆N₂O₆S (634.83): ber. C 68.11, H 7.30, N 4.41, gef. C 68.25, H 7.33, N 4.39.

4. 1-(3-Hydroxypropyl)-4-[3-(7-N,N-diethylamino-2-(1,1-dimethylethyl)-4H-benzopyran-4-yliden)-1-propenyl]-chinolinium-tetrafluoroborat OB 14:

0.01 mol 2a und 0.01 mol 1-(3-Hydroxypropyl)-4-methylchinolinium-iodid wurden entsprechend der allgemeinen Vorschrift 1 umgesetzt. Säulenchromatographie: SiO₂, Eluent Toluol/Ethanol 1/1. 2.4 g (42 %) Ausbeute, 162-64°C Schmelzpunkt. - ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 1.17 (t, 6H), 1.32 (s, 9H), 2.14 (m, 2H), 2.25 (s, 1H), 3.39 (q, 4H), 3.71 (m, 2H), 4.89 (m, 2H), 6.31 (d, 1H), 6.56 (s, 1H), 6.62 (m, 2H), 7.01 (d, 1H), 7.60 (t, 1H), 7.67 (d, 1H), 7.77 (d, 1H), 7.84 (t, 1H), 7.93 (d, 1H), 8.12 (t, 1H), 8.31 (d, 1H), 9.27 (d, 1H). - ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 12.52, 28.08, 32.01, 36.20, 44.61, 52.53, 57.52, 97.05, 97.94, 109.58, 109.94, 110.91, 111.77, 113.61, 117.72, 124.79, 125.38, 125.50, 127.13, 133.64, 137.96, 140.92, 142.20, 144.96, 150.87, 151.74, 155.40, 167.12 - MS (FAB in dmba): 483 (M⁺) - C₃₂H₃₉BF₄N₂O₂ (570.48): ber. C 67.37, H 6.89, N 4.91, gef. C 67.30, H 6.92, N 4.89.

5. 1-(5-Carboxypentyl)-3,3-dimethyl-2-[3-(11-(2,2-dimethylethyl)-1H,2H,3H,5H,6H,7H-pyrano[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]chinolin-9-yliden)-1-propenyl]-3H-indolium-5-sulfonat OB 15 (DY-635):

0.01 mol 2b und 0.01 mol 1-(5-Carboxypentyl)-2,3,3-trimethyl-3H-indolium-5-sulfonat wurden entsprechend der allgemeinen Vorschrift 1 umgesetzt.

Säulenchromatographie: SiO₂, Eluent Ethanol. 2.9 g (44 %) Ausbeute, >300°C Schmelzpunkt. - ¹H NMR (250 MHz, DMSO-d₆): 1.10 – 1.56 (m, 19H), 1.91 (m, 4H), 2.08 (m, 4H), 2.83 (m, 4H), 3.38 (m, 4H), 4.03 (m, 2H), 6.45 (d, 1H), 6.97 (s, 1H), 7.13 (d, 1H), 7.26 (d, 1H), 7.62 (d, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 8.23 (t, 1H) - ¹³C NMR (62 MHz, DMSO-d₆): 19.40, 20.43, 24.86, 25.98, 26.61, 27.16, 27.76, 27.85, 28.94, 35.17, 36.71, 43.40, 48.45, 49.04, 49.63, 99.24, 102.90, 105.09, 109.69, 110.03, 112.96, 119.71, 121.85, 123.50, 139.89, 142.18, 144.84, 145.76, 148.56, 148.86, 151.59, 170.08, 171.37 - MS (ESI): 681 (M+Na⁺), 659 (M+H⁺), 352 - C₃₈H₄₆N₂O₆S (658.12): ber. C 69.27, H 7.34, N 4.25, gef. C 69.20, H 7.37, N 4.29.

6. 1-(5-Carboxypentyl)-4-[3-(7-N,N-diethylamino-2-(1,1-dimethylethyl)-4H-benzo-pyran-4-yliden)-1-propenyl]-chinolinium-6-sulfonat OB 20:
0.01 mol 2a und 0.01 mol 1-(5-Carboxypentyl)-4-methyl-chinolinium-6-sulfonat wurden entsprechend der allgemeinen Vorschrift 1 umgesetzt.
Säulenchromatographie: SiO₂, Eluent Ethanol. 2.1 g (35 %) Ausbeute, >300°C Schmelzpunkt. - C₃₅H₄₂N₂O₆S (618.76): ber. C 67.93, H 6.84, N 4.53, gef. C 67.73, H 6.93, N 4.29.

7. Darstellung des NHS-Esters von OB 11 (DY-630) mit N-Hydroxysuccinimid (NHS)/N,N'-Dicyclo-hexylcarbodiimid (DCC)
15 mg OB 11 (DY-630), 14 mg DCC und 4 mg NHS wurden in 1 ml trockenem DMF gelöst. Dann gab man 10 µl Triethylamin zu. Das Reaktionsgemisch wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend filtriert. Dann wurde das Lösungsmittel abgezogen, der Rückstand mit Ether gewaschen. Diese Reaktion verlief quantitativ.

8. Darstellung des NHS-Esters von OB 15 (DY-635) mit N-Hydroxysuccinimid (NHS)/N,N'-Dicyclo-hexylcarbodiimid (DCC)
Es wurde analog zum Beispiel Nr. 7 verfahren. Auch diese Reaktion verlief quantitativ.

9. Anregungs- und Emissionsspektren von 1-(5-Carboxypentyl)-3,3-dimethyl-2-[3-(11-(2,2-dimethylethyl)-1H,2H,3H,5H,6H,7H-pyrano[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]chinolin-9-yliden)-1-propenyl]-3H-indolium-5-sulfonat OB15 (DY-635)

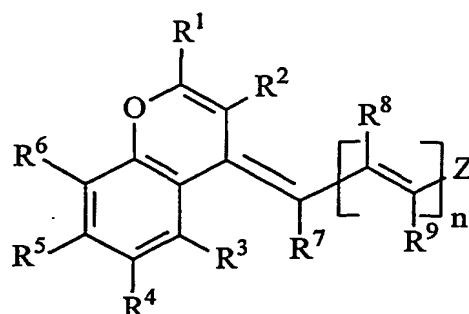
Die Abbildungen in Fig. 4 zeigen die Emissions- und in Fig.5 die Anregungsspektren von 1-(5-Carboxypentyl)-3,3-dimethyl-2-[3-(11-(2,2-dimethylethyl)-1H,2H,3H,5H,6H,7H-pyrano [2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]chinolin-9-yliden)-1-propenyl]-3H-indolium-5-sulfonat in Wasser und nichtkovalent gebunden an Rinder-Serum-Albumin (BSA), wobei jeweils das intensivere Spektrum das BSA konjugat kennzeichnet. Beide Farbstofflösungen waren bei diesen Messungen gleich konzentriert.

10. Allgemeine Vorschrift zur Markierung von Proteinen

Die Proteinmarkierungen wurden in einem 50 mM Bicarbonatpuffer (pH 9,0) ausgeführt. Es wurde eine Stammlösung mit 0.5 mg Reaktivfarbstoff (z. B. OB 11-NHS-ester, $M=732 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) in 100 μl DMF hergestellt. Das Protein, z.B. Avidin ($M=66000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) wurde portionsweise zu je 1 mg in 200 ml Bicarbonatpuffer gelöst, worauf verschiedene Volumina der ggf. verdünnten Farbstoff-Stammlösung zu den einzelnen Protein-Aliquots hinzugegeben wurden. Dann wurden die Reaktionsgemische 1 - 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der freie Farbstoff wurde von den markierten Proteinen durch Gelchromatographie (Sephadex G25 medium, Eluent PBS pH 7.2 22mM) abgetrennt.

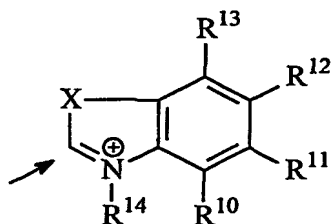
Patentansprüche

1. Marker-Farbstoffe auf der Basis von unsymmetrischen Polymethinen, die eine substituierte ω -(Benz[b]pyran-4-yliden)alk-1-enyl-Einheit der allgemeinen Struktur I

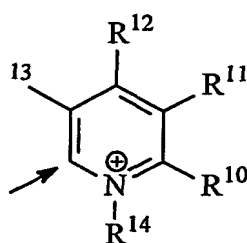


I

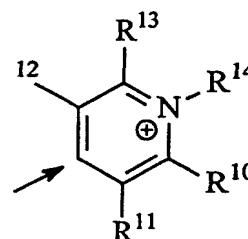
enthalten mit Z als substituierten Benzooxazolium-, Benzothiazolium-, 3,3-Dimethylindolium-, 3,3-Dimethyl-4,5-benzo-3H-indolium-, 2- und 4-Pyridinium-, 2- und 4-Chinolinium- sowie 9-Acridinumderivaten der allgemeinen Formeln IIa oder IIb oder IIc



IIa



IIb



IIc

wobei

- X für ein Element aus der Gruppe O, S, Se oder das Strukturelement N-alkyl oder C(alkyl)₂ stehen,
- n für die Zahlenwerte 0, 1, 2 oder 3 steht,

- 5 - $R^1 - R^{14}$ gleich oder unterschiedlich sind und Wasserstoff, ein oder mehrere Alkyl-, oder Aryl-, Heteroaryl- oder heterocycloaliphatische Reste, eine Hydroxy- oder Alkoxygruppe, eine alkylsubstituierte oder cyclische Aminfunktion sein können und/oder zwei *ortho*-ständige Reste, z. B. R^{10} und R^{11} , zusammen einen weiteren aromatischen Ring bilden können,
- 10 - mindestens einer der Substituenten $R^1 - R^{14}$ einen solubilisierenden bzw. ionisierbaren bzw. ionisierten Substituenten, wie Cyclodextrin, Zucker, SO_3^- , PO_3^{2-} , COO^- , oder NR_3^+ darstellen kann, der die hydrophilen Eigenschaften dieser Farbstoffe bestimmt, wobei dieser Substituent auch über eine Spacergruppe am Markerfarbstoff angebunden sein kann,
- 15 - mindestens einer der Substituenten $R^1 - R^{14}$ für eine reaktive Gruppe stehen kann, welche eine kovalente Verknüpfung des Farbstoffs mit einem anderen Molekül ermöglicht, wobei dieser Substituent auch über eine Spacergruppe am Markerfarbstoff angebunden sein kann, und
- 20 - R^1 einen Substituenten darstellt, der in α -Position zum Pyran-Ring ein quartäres C-Atom aufweist, wobei die Substituenten R^1 und R^2 auch ein aliphatisches bzw. substituiertes aliphatisches Ringsystem bilden können.
- 25 2. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die reaktive Gruppe aus folgenden Funktionalitäten ausgewählt ist: Isothiocyanate, Isocyanate, Monochlortriazine, Dichlortriazine, Aziridine, Sulfonylhalogenide, Carbonsäurechloride, *N*-Hydroxysuccinimidester, Imido-Ester, Glyoxal oder Aldehyd für Amin- und Hydroxy-Funktionen bzw. Maleimide oder Iodacetamide für Thiol-Funktionen sowie Phosphoramidite für die Markierung der DNA oder RNA oder deren Bruchstücke.
- 30

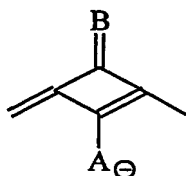
3. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 1-2, dadurch gekennzeichnet, dass die reaktive Gruppe über Spacer-Gruppen der allgemeinen Struktur $-(CH_2)_m-$ am eigentlichen Chromophor gebunden ist, wobei m Werte von 1 bis 18 annehmen kann.

5

4. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, dass die Struktureinheit $=CR^8-$ auch eine Verbrückung über vier-, fünf- und sechsgliedrige Ringsysteme beinhaltet, wobei sich an dieser auch reaktive Gruppen befinden und die Substituenten A - G die gleiche Funktionalität wie die Substituenten $R^1 - R^{14}$ besitzen können.

10

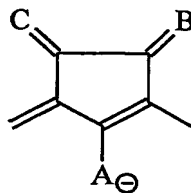
5. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Struktureinheit $=CR^8-$ für



steht.

15

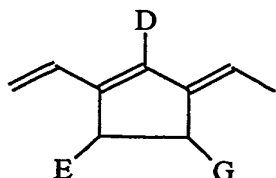
6. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Struktureinheit $=CR^8-$ für



steht.

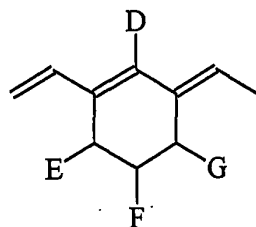
20

7. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Struktureinheit $=CR^8-$ für



steht.

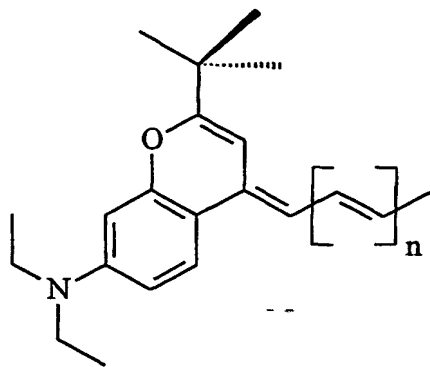
8. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Struktureinheit =CR⁸- für



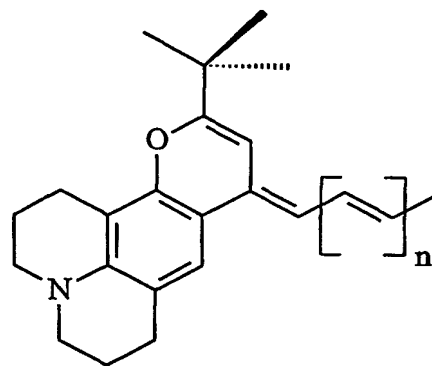
steht.

9. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß den Ansprüchen 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass die Substituenten A - G die gleiche Gestalt wie die Substituenten R¹ bis R¹⁴ annehmen können oder für O, S, C(CN)₂ bzw. N-R stehen, wobei R in N-R für einen aliphatischen oder aromatischen bzw. einem reaktiven aliphatischen oder aromatischen Rest, wie (CH₂)_nCOOH oder (CH₂)_nNH₂, stehen kann.
10. Laser-kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß den Ansprüchen 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass der Substituent D für Cl, einen Alkyl-, Alkoxy-, Cycloalkoxy-, Phenolat, Alkylmercapto oder Phenylmercapto-Rest steht, an dem gegebenenfalls reaktive Substituenten entsprechend den Substituenten R¹ bis R¹⁴ angebracht sind.
11. Laser- kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Substituent R¹ für 1,1-Dimethylethyl, 6,6-Dimethylbicyclo-[3,1,1]hept-2-en-2-yl, Bicyclo[2,2,1]-hept-2-en-5-yl, 3,3-Dimethylbut-1-en-1-yl oder Adamant-1-yl (-C₁₀H₁₅ / Tricyclo[3.3.1.1^{3,7}] decyl) steht.
12. Laser- kompatible NIR-Marker-Farbstoffe gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Substituent R⁵ für einfach oder doppelt alkyliertes Amin steht, wobei über den Aminostickstoff Alkyl - und Alkenylverbrückungen mit den Substituenten R⁴ und R⁶ möglich sind.

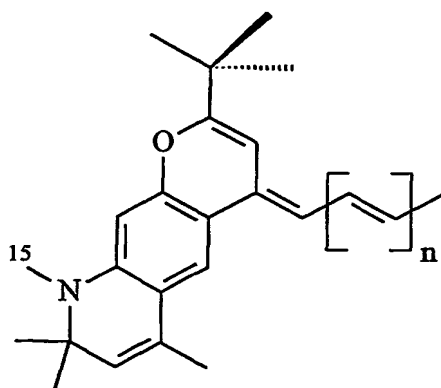
13. Laserkompatible NIR-Farbstoffe gemäß den Ansprüchen 1-12, dadurch gekennzeichnet, dass der ω -(Benz[b]pyran-4-yliden)alk-1-enyl)-Teil der Farbstoffe folgende Struktur Ia, Ib, Ic oder Id besitzt



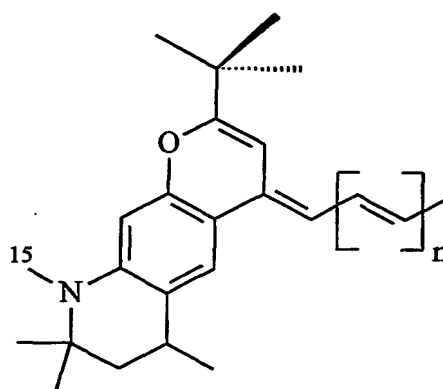
Ia



Ib



Ic



Id

wobei der Substituent R^{15} die gleichen Funktionalitäten wie die Substituenten R^1 bis R^{14} besitzen kann.

14. Einen Laser-kompatiblen Markerfarbstoff gemäß den Ansprüchen 1-13, dergestalt dass

- a. $R^2, R^3, R^4, R^6, R^7, R^8, R^9$ gleich H, R^1 gleich 1,1-Dimethylethyl, R^5 gleich N,N-Diethylamino, $n=1$, Z gleich IIa mit R^{10}, R^{11}, R^{13} gleich H, R^{12} gleich SO_3^- und R^{14} gleich 5-Carboxypent-1-yl, namentlich 1-(5-Carboxypent-1-yl)-3,3-dimethyl-2-[3-(7-N,N-diethylamino-2-(1,1-dimethylethyl)-4H-benzopyran-4-yliden)-1-propen-1-yl]-3H-indolium-5-sulfonat (OB11)

- b. R², R³, R⁷, R⁸, R⁹ gleich H, R⁴, R⁵, R⁶ zusammen einen Julolidin-Ring bilden, R¹ gleich 1,1-Dimethylethyl, n=1, Z gleich gleich IIa mit R¹⁰, R¹¹, R¹³ gleich H, R¹² gleich SO₃⁻ und R¹⁴ gleich 5-Carboxypent-1-yl, namentlich 1-(5-Carboxypentyl)-3,3-dimethyl-2-[3-(11-(2,2-dimethylethyl)-1H,2H,3H,5H,6H,7H-pyrano[2,3-f]pyrido [3,2,1-ij]chinolin-9-yliden)-1-propenyl]-3H-indolium-5-sulfonat (OB15)
- 5
- c. R², R³, R⁴, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹ gleich H, R¹ gleich 1,1-Dimethylethyl, R⁵ gleich N,N-Diethylamino, n=1, Z gleich IIc mit R¹⁰, R¹¹ gleich H, R¹² und R¹³ zusammen einen ankondensierten Ring der Struktur CH=C(SO₃⁻)-CH=CH bilden und R¹⁴ gleich 5-Carboxypent-1-yl, namentlich 1-(5-Carboxypent-1-yl)-4-[3-(7-N,N-diethylamino-2-(1,1-dimethylethyl)-4H-benzopyran-4-yliden)-1-propen-1-yl]-chinolinium-6-sulfonat (OB20)
- 10
- d. R², R³, R⁴, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹ gleich H, R¹ gleich 1,1-Dimethylethyl, R⁵ gleich N,N-Diethylamino, n=1, Z gleich IIc mit R¹⁰, R¹¹ gleich H, R¹² und R¹³ zusammen einen ankondensierten Ring der Struktur CH=CH-CH=CH bilden und R¹⁴ gleich 3-Hydroxyprop-1-yl, namentlich 1-(3-Hydroxyprop-1-yl)-4-[3-(7-N,N-diethylamino-2-(1,1-dimethylethyl)-4H-benzopyran-4-yliden)-1-propen-1-yl]-chinolinium-Perchlorat (OB14).
- 15
- 20 15. Verwendung der substituierten Pyran-Derivate der allgemeinen Formel I als Farbstoffe zur optischen Markierung von Proteinen, Nukleinsäuren, Oligomeren, DNA, RNA, biologischen Zellen, Lipiden, Polymeren, Pharmaka oder Polymerpartikeln.
- 25 16. System zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung von Proteinen, Nukleinsäuren, Oligomeren, DNA, RNA, biologischen Zellen, Lipiden, Polymeren, Pharmaka oder Polymerpartikeln, dadurch gekennzeichnet, dass die funktionellen Gruppen der Verbindungen nach Anspruch 1 bis 14 kovalent an eine OH-, NH₂- oder SH-Funktion der zu bestimmenden Substanzen
- 30 gekoppelt werden.

17. System nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Kopplungsreaktion in wässriger Lösung durchgeführt wird.
- 5 18. System nach Anspruch 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass die kovalent gekoppelte Verbindung fluoreszierende Eigenschaften aufweist.
- 10 19. Verwendung der Verbindungen und Systeme nach Anspruch 1 bis 18 in optischen, insbesondere fluoreszenzoptischen qualitativen und quantitativen Bestimmungsverfahren einschließlich Immuntests, Hybridisierungsverfahren, chromatographischer oder elektrophoretischer Verfahren und des Hoch-Durchsatz-Screenings.
- 15 20. Verwendung der in den Ansprüchen 1 bis 18 aufgeführten Verbindungen und Systeme zur Analyse von Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen auf einem Mikroarray.



.

.

1

1

1/3

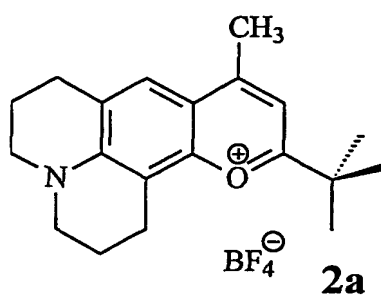


Fig. 1



Fig. 2



157

2/3

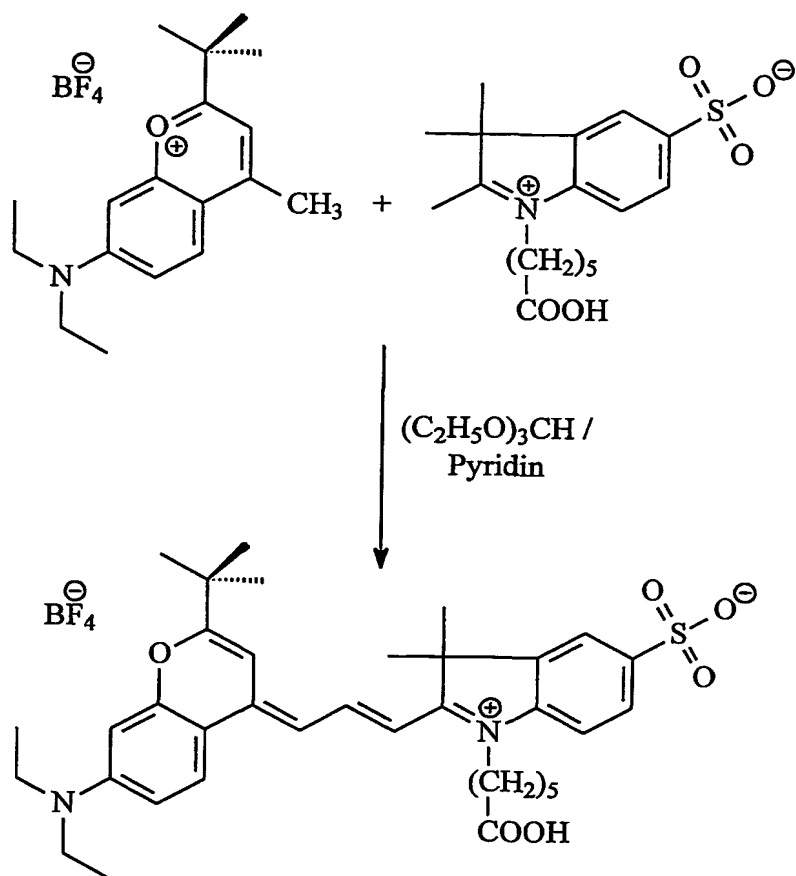


Fig. 3



3/3

DY 635, Anregung bei 600 nm

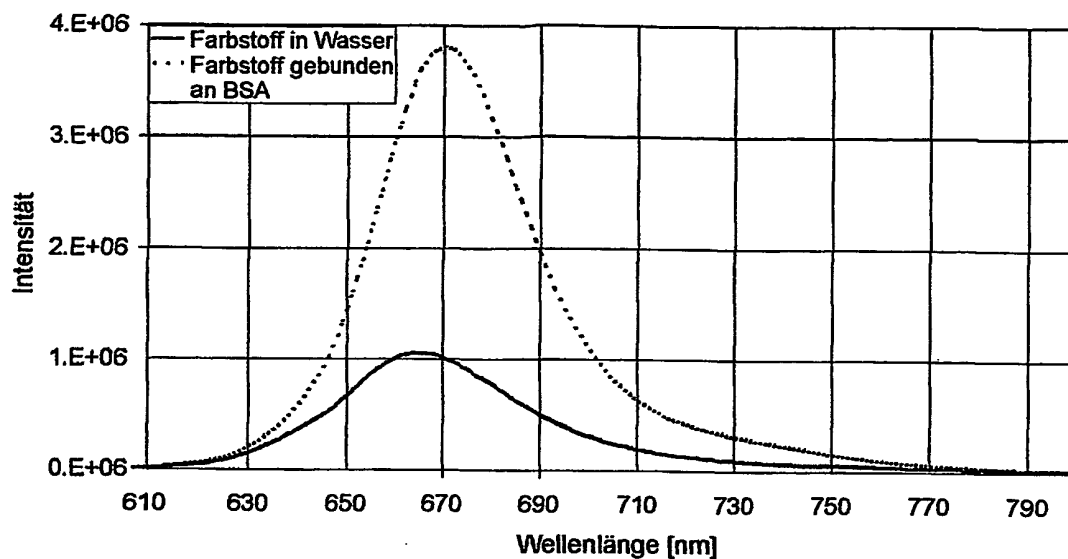


Fig. 4

DY 635, Emission bei 600 nm

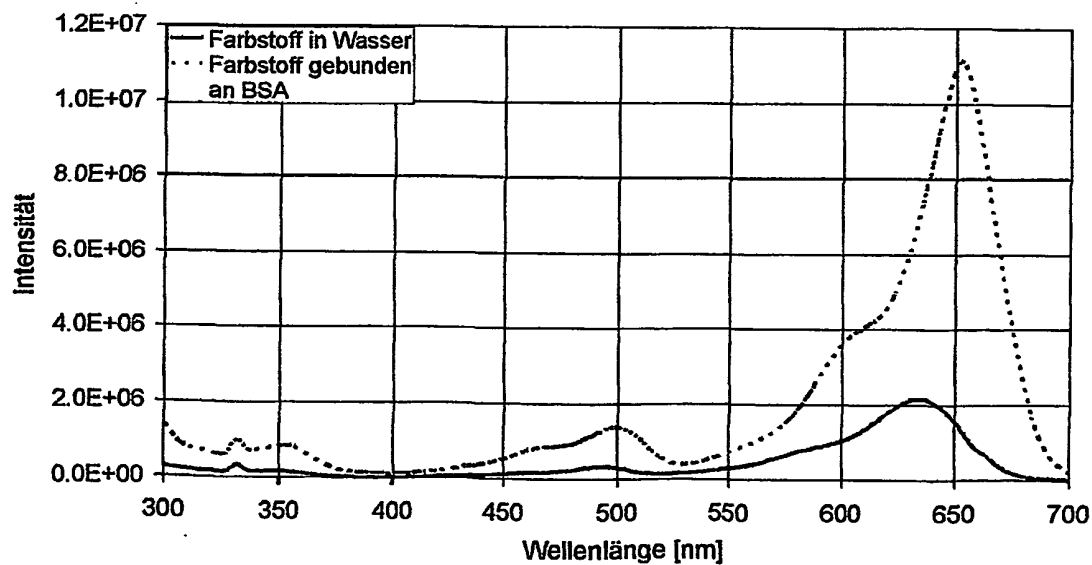


Fig. 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/DE 01/01946

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C09B23/02 C09B23/01 G01N33/533 G01N33/58 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C09B G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 43 41 618 A (UNIV SCHILLER JENA) 8 June 1995 (1995-06-08) the whole document	1-4, 9-20
A	GADJEV N ET AL: "MONOMETHINE CYANINE DYES CONTAINING BENZ'c,d!INDOLE AND PYRYLIUM END-GROUPS" DYES AND PIGMENTS, ELSEVIER APPLIED SCIENCE PUBLISHERS. BARKING, GB, vol. 24, no. 2, 1994, pages 93-98, XP000434501 ISSN: 0143-7208 Formeln 5a - 5f; Tabelle I	1
A	US 3 567 438 A (BROOKER LESLIE G S ET AL) 2 March 1971 (1971-03-02) examples 1,2,4,5	1
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 October 2001

Date of mailing of the international search report

05/11/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ketterer, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: Application No

PCT/DE 01/01946

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 198829 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class E23, AN 1988-202526 XP002181113 & JP 63 141068 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD), 13 June 1988 (1988-06-13) abstract -----	1
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 198829 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class E23, AN 1988-200310 XP002181114 -& JP 63 136054 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD) , 8 June 1988 (1988-06-08) abstract -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern: Application No

PCT/DE 01/01946

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4341618	A	08-06-1995	DE 4341618 A1	08-06-1995
US 3567438	A	02-03-1971	BE 730291 A	01-09-1969
			DE 1804316 A1	16-10-1969
			FR 2004640 A5	28-11-1969
			GB 1243714 A	25-08-1971
JP 63141068	A	13-06-1988	NONE	
JP 63136054	A	08-06-1988	NONE	



10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internal \Rightarrow Aktenzeichen

PCT/DE 01/01946

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C09B23/02 C09B23/01 G01N33/53 G01N33/58 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C09B G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 43 41 618 A (UNIV SCHILLER JENA) 8. Juni 1995 (1995-06-08) das ganze Dokument	1-4, 9-20
A	GADJEV N ET AL: "MONOMETHINE CYANINE DYES CONTAINING BENZ'C,d!INDOLE AND PYRYLIUM END-GROUPS" DYES AND PIGMENTS, ELSEVIER APPLIED SCIENCE PUBLISHERS. BARKING, GB, Bd. 24, Nr. 2, 1994, Seiten 93-98, XP000434501 ISSN: 0143-7208 Formeln 5a - 5f; Tabelle I	1
A	US 3 567 438 A (BROOKER LESLIE G S ET AL) 2. März 1971 (1971-03-02) Beispiele 1,2,4,5	1
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Oktober 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

05/11/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ketterer, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PCT/DE 01/01946

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 198829 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class E23, AN 1988-202526 XP002181113 & JP 63 141068 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD), 13. Juni 1988 (1988-06-13) Zusammenfassung</p>	1
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 198829 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class E23, AN 1988-200310 XP002181114 -& JP 63 136054 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD) , 8. Juni 1988 (1988-06-08) Zusammenfassung</p>	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen

PCT/DE 01/01946

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 4341618 A	08-06-1995	DE 4341618 A1	08-06-1995
US 3567438 A	02-03-1971	BE 730291 A	01-09-1969
		DE 1804316 A1	16-10-1969
		FR 2004640 A5	28-11-1969
		GB 1243714 A	25-08-1971
JP 63141068 A	13-06-1988	KEINE	
JP 63136054 A	08-06-1988	KEINE	



11

1